10.22092/sppi.2021.123897

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

# شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های آلو ژاپنی (*Prunus salicina* Lindl.) با استفاده واکنش زنجیره ای پلی‌مراز

# Identification of Self-Incompatibility Alleles in Some Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Cultivars and Genotypes Using Polymerase Chain Reaction

محی الدین پیرخضری

استادیار، پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۷**

## چکیده

**پیر خضری، م. ۱۳۹۹.** شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های آلو ژاپنی (*Prunus salicina* Lindl.) با استفاده واکنش زنجیره ای پلی مراز. **مجله نهال و بذر۳۶:** ۵۲۶-۵۰۹.

**آلوها در بین مهمترین درختان میوه در جهان قرار دارند. آلوهای ژاپنی دیپلوئید و اغلب ارقام خودناسازگارند. شناسایی آلل‌های خودناسازگاری برای گسترش این محصول و دورگ گیری ضروری است. در این تحقیق آلل‌های خودناسازگاری ۱۴ ژنوتیپ آلوی ژاپنی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و گرده افشانی کنترل شده، شناسایی شد. با به کار بردن هفت جفت آغازگر مکان ژن‌های *S-Rnase* و *SFB* تنوع بالایی در آلل‌های ناسازگاری مشاهده شد. هیجده باند با اندازه‌های ۲۱۵ تا ۱۷۳۴ جفت باز با جفت آغازگرهای EMPC2consFD وEMPC3consRD تکثیر گردید. با مقایسه اندازه باندهای بدست آمده با اندازه آلل‌های *S* موجود در NCBI، تعداد پنج باند با اندازه‌های جدید مشاهده شد که پس از توالی‌یابی می‌توانند کاندیدای آلل جدید باشند. ارقام آلو سنقر آبادی، شماره ۱۶ و واعظی دارای آلل *Sb* بودند که عامل خودسازگاری است و با خودگرده افشانی، واعظی، سنقرآبادی و شماره ۱۶به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۲۱ و ۰/۳۲ درصد خودباروری داشتند. نتایج خودگرده افشانی نشان داد که اغلب ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی خودناسازگار بودند، اما رقم سیمکا با ۲/۹ درصد خودباروری نیمه خود(نا)سازگار بود. بیشترین میانگین آلل تکثیر شده در آغازگرها مربوط به ارقام لارودا و بلک آمبر و کمترین آلل تکثیر شده مربوط به ارقام شایرو و قطره طلا بود. بر اساس نتایج این پژوهش روش‌های مولکولی در ترکیب با روش‌های باغی در شناسایی آل های ناسازگاری بسیارکارآمد هستند.**

**واژه های کلیدی: آلو، آغازگر، خودگرده‌افشانی، خودسازگار، روش های مولکولی.**

نگارنده: m.pirkhezri@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

## مقدمه

آلوها یکی از میوه‌های مهم مناطق معتدل هستند. ایران با تولید ۳۱۳ هزار تن آلو رتبه پنج در جهان را دارا می باشد (FAO, 2018). آلو متعلق به خانواده Rosasae زیرخانواده Prunoidae و جنس Prunus با عدد کروموزومی پایه X = 8 می‌باشد. عمده آلوهای تجاری شامل آلوهای اروپایی (*P. domestica*) هگزاپلوئید (n = 6x = 48) و آلوهای ژاپنی (*P. salicina*) دیپلوئید (n = 2x = 16) می‌باشند.

میوه‌دهی در آلو و بعضی از اعضای خانواده گل سرخیان مانند سیب، بادام، زردآلو و گیلاس متاثر از عوامل ژنتیکی و محیطی نظیر درجه حرارت زمستان (Gu *et al*., 2009) (Ruck, 1975; Saure, 1985)، همزمانی دوره گلدهی (Verma and Jindal, 1997) و خودناسازگاری (Crane and Lewis, 1942) است. در صورت وجود خود ناسازگاری، با وجود زنده بودن هر دو عضو جنسی، دانه گرده قادر به باروری مادگی نیست و در نتیجه از عوامل مهم محدود کننده تولید میوه به شمار می‌آید (Hiratsuka and Zhang, 2002).

اکثر آلوهای ژاپنی خودناسازگار هستند و گرده افشانی و لقاح برای تشکیل میوه ضروری است. بنابراین خودناسازگاری آن‌ها مورد مطالعه گسترده قرار گرفته است. جهت تولید میوه اقتصادی و افزایش عملکرد در باغ‌های تجاری شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و معرفی گرده زا ضروری است (Lopez *et al*., 2006).

برای مطالعه‌ی خود(نا)سازگاری از روش‌های گرده افشانی کنترل شده و بررسی میزان تشکیل میوه، بررسی رشد لوله گرده در تخمدان و روش‌های مولکولی استفاده می‌شود (Murfett *et al*., 1992; Ishimizu *et al*., 1999).

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR) روشی سریع، دقیق و کار آمد در ارزیابی خود ناسازگاری است. ژن *S* ریبونوکلئاز در خانواده رزاسه دارای ساختمان مشابهی است و شامل پنج منطقه حفاظت شده (C1-C5) و یک منطقه با تنوع بالا که دارای دو اینترون است(Ushijima *et al*., 1998). آلوهای دیپلویید (آلو ژاپنی و میروبالان) کاملا خودناسازگارند و خودسازگاری یک پدیده استثنایی در بین آن‌هاست (Szabo, 2003; Hegedus and Halasz, 2006). آلل‌های *S* وگروه‌های ناسازگاری تعدادی از درختان میوه مانند گیلاس (Wang *et al*., 2010)، بادام (Halasz *et al*., 2008) و زردآلو (Feng *et al*., 2006) با استفاده از روش‌های مولکولی گزارش شده است.

تعیین اولین آلل *S* در آلو ژاپنی (رقم سوردوم) گزارش شده است (Yaman *et al*. 1999). شناسایی ۱۴ آلل با آغازگرهای ژن *S-RNase* نشان داد که ژن آلوی ژاپنی همانند دیگر گونه‌های جنس پرونوس دارای دو اینترون است (Beppu *et al*., 2003). تا کنون ۳۶ آلل *S* در

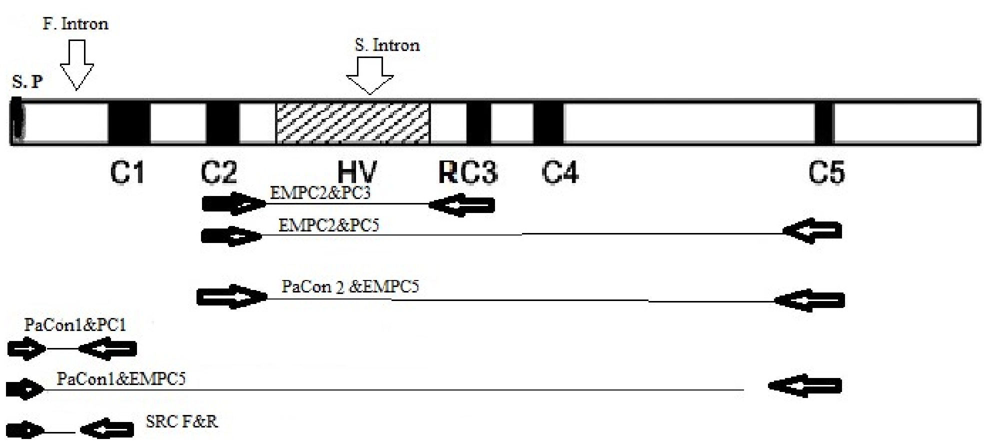
۲۱ گـــروه ناســـازگاری در آلـــوی ژاپنـــی گـزارش شـده اسـت (Sapir *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2008; Guerrra *et al*., 2009; Guerrra *et al*., 2012).

هـدف از ایـن پـژوهش شناسـایی آلـل‌هـای ناسازگاری در برخی ارقام و ژنوتیپ‌هـای آلـوی ژاپنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مـراز و ارزیابی باغی خود(نا)سازگاری در آنها بود.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۱۴ رقم و ژنوتیپ آلـو ژاپنـی موجـود در کلکسـیون پژوهشـکده میـوه هـای معتدله و سردسیری، ایسـتگاه کمالشـهر، موسسـه تحقیقات علـوم باغبـانی، شـامل قطـره طـلا، آلـو زرد، بلـک اسـتار، سـنقرآبادی، سـیمکا، ابلنایـا، شـماره ۱۶، شـماره ۱۷، مـورتینی، فریـار، لارودا، واعظی، شایرو و بلک امبر جهت تعیین آلل های خوناسازگاری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اســتخراج DNA بـــا اســـتفاده از روش مینـــی پـــرب (۰/۱ گـــرم نمونـــه بـــرگ) (Murray and Thompson, 1980) بـا انـدکی تغییــر در آزمایشــگاه ملکــولی پژوهشــکده میــوه هــای معتدلیــه و سردســیری موسســه تحقیقـــات باغبـــانی در کـــرج انجـــام گردید(Pirkhezri, 2019). جهت تعیین کمیـت و کیفیت DNA از ژل آگـارز و نـانودراپ مـدل (Thermo Scientific, 1000) اسـتفاده شـد. غلظـت DNA در نمونـه‌هـا بـه ۱۵ نـانوگرم بـر میکرو لیتر رسانده شد. در این پـژوهش از هفـت جفت آغازگر عمومی اینتـرون اول، اینتـرون دوم و جفـــت اینتـــرون ژن *S-RNase* و ژن *SFB* استفاده گردید (جدول ۱ و شکل ۱).




شکل ۱- نواحی تکثیر شده توسط آغازگرهای مورد استفاده

Fig. 1. Amplified region by primers used

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای تکثیر آلل‌های *S* ارقام و ژنوتیپ‌های آلو

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for *S*-alleles amplification of plum cultivars and genotypes

| آغازگر<br>Primer | نوع آغازگر<br>Primer type | توالی آغازگر<br>Primer sequence | منبع<br>References |
|---|---|---|---|
| EM-PC2consFD | Forward پیش رو | 5'-TCAC(A/C)AT(C/T)CATGGCCTATGG-3' | Sutherland, 2004 |
| EM-PC5consRD | Reverse معکوس | 5'-CAAAATACCACTTCATGTAACA(G/A)C-3' | Sutherland, 2004 |
| EM-PC3consRD | Reverse معکوس | 5'-A(A/T)(C/G)T(A/G)CC(A/G)TG(C/T)TTTGTCCATTC-3' | Sutherland, 2004 |
| PaConsI-FD | Forward پیش رو | 5'-(C/A)CTTGTTCTTG(C/G)TTT (T/C)GC TTTCTT C-3' | *S-RNase* |
| EM-PC1consRD | Reverse معکوس | 5'-GCC A(C/T)T GTT G(A/C)A CAA A(C/T)T GAA-3' | *S-RNase* |
| *SFB*c-FD | Forward پیش رو | 5'-TCGACATCCTAGTAAGACTACCTGC-3' | Vilanova, 2006 |
| *SFB*c-RD | Reverse معکوس | 5'-ATTTCTTCACTGCCTGAATCG-3' | Vilanova, 2006 |
| SRc-FD | Forward پیش رو | 5'-CTCGCTTTCCTTGTTCTTGC-3' | Romero, 2004 |
| SRc-RD | Reverse معکوس | 5'-GGCCATTGTTGCACAAATTG-3' | Vilanova, 2005 |
| PaConsII-FD | Forward پیش رو | 5'-GGCCAAGTAATTATTCAAACC-3' | Sonneveld, 2003 |
| PaConsII-RD | Reverse معکوس | 5'-CA(T/A)AACAAA(A/G)TACCACTTCATGTAAC-3' | Sonneveld, 2003 |

واکـنش زنجیـره‌ای پلـی‌مـراز بـا اسـتفاده ازدسـتگاه ترموسـایکلر مـدل Master Cycler Gradient سـاخت کشـور آلمـان در حجـم ۱۷ میکرولیتر، شـامل سـه میکرولیتـر DNA ژنـومی، ۱/۵ میکرولیتر از غلظـت پـنج میکـرو مـولار هـر آغازگر، ۷/۵ میکرو لیتر از محلـول کیـت PCR، ۳/۵ میکـرو لیتـر آب دو بـار تقطیـر تهیـه شـد. چرخـه حرارتـی شـامل یـک مرحلـه واسرشـت سـازی اولیـه در دمـای ۹۴ درجـه و بـه مـدت دو دقیقه، ۳۵ سـیکل حرارتـی کـه کـه بـرای برخـی آغـاز گرهـا ۱۰ چرخـه اول سـیکل حرارتـی بـه صورت Touch Down برنامه‌ریزی شده بود. بـه این صورت که دمـای اتصـال آغـازگر بـه رشـته الگو ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمـای اتصـال واقعی در نظر گرفته شد (۶۰ درجـه بـرای دمـای اتصـال ۵۰ درجـه) و در هـر چرخـه دور اول بـا کاهش یک درجه دمـا، بـه دمـای اتصـال واقعـی رسـید. ایـن کـار تـا حـدودی از ایجـاد بانـدهای کاذب می‌کاهد. در ۲۵ سیکل بعد دمـای اتصـال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بـود) و زمان آن نیز متغیر بود(Pirkhezri, 2019).

بانــدهای تکثیــری محصــول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز (تهیـه شـده بـا بـافر TAE (1X)) جداســازی شــد. بانــدها در ژل‌هــا در تانـک الکتروفـورز (Bio-Rad, USA) بـا ولتـاژ ۷۵ در مــدت ۳/۵ ســاعت جداســازی شــدند. جهــت رنــگ آمیــزی ژل‌هــا از مــاده ژل رد (Gel Red, Biotium, USA) ( شماره کاتالوگ ۴۱۰۰۳) یـک مـاکرولیتر در ۷۰ میلـی لیتـر ژل استفاده گردید. سپس ژل‌ها در ژل داک در زیـر نور ماورا بنفش آشکار و تصویر بـرداری شـدند. اندازه باندهای تکثیر شده در ژنوتیـپ‌هـا و ارقـام آلو با استفاده از نشانگر اندازه یـک کیلـو جفـت بـازی (فرمنتـاز شـمار کاتـالوگ ۰۳۱۳) بـرای باندهای با سـایز بـزرگ و ۱۵۰۰ جفـت بـازی بـا فاصـله بانــدهای ۵۰ و ۱۰۰ جفــت باز(ســاخت شرکت سینا کلون ایران) برآورد شد.

فواصل طی شده باندها با استفاده از نرم افـزار Quantity one (شـرکت Bio-Rad) در مقایسـه با لدر بدست آمد و با استفاده از نرم افـزار اکسـل رگرسیون فاصله طی شـده بانـدهای نشـانگر (Y) بـر انـدازه بانـدهای نشـانگر (X) بـرازش شـد و فرمول مربوطه بدست آمـد (Pirkhezri, 2019). اندازه آلل‌های *S* آلوکـه تـوالی آن‌هـا در NCBI گزارش شده است بررسـی و بـا انـدازه بانـدهای بدسـت آمـده در ایـن بررسـی بـرای هـر جفـت آغازگر مقایسه شدند.

در شرایط باغ، برای تعیین خود(نا)باروری، از دو روش گرده افشانی ایزوله (خود گرده افشـانی مصـنوعی) و گـرده افشـانی آزاد در قالـب طـرح بلوک های کامـل تصـادفی بـا سـه تکـرار انجـام گردیـد. بـه ایـن منظـور روی هـر یـک از سـه درخت، چهار شاخه و در چهار جهت جغرافیایی آن، یک هفته قبل از مرحله بالونی انتخاب و غیـر از شاخه های مربوط به تیمـار گـرده افشـانی آزاد که به عنوان شـاهد، بـدون ایزولـه کـردن درنظـر گرفته شدند، بقیه شاخه ها به منظور جلوگیری از گرده افشانی آزاد و ناخواسته، با کیسه هـای پنبـه

ای (ململ) ایزوله شدند.

برای خود گرده افشانی مصنوعی، جمع آوری دانه گرده، در زمانی که جوانه های گل در مرحله بالونی بودند، انجام شد. در خود گرده افشانی مصنوعی، گل های ایزوله شده، با دانه های گرده جمع آوری شده از همان رقم و با استفاده از پنبه های گوش پاک کن (هر خلال مخصوص یک ژنوتیپ بود) گرده افشانی در زمان تمام گل دو بار با فاصله ۲۴ ساعت انجام شد. تعداد گل های گرده افشانی شده در هر شاخه ایزوله و گرده افشانی آزاد شمارش گردیدند. میوه های اولیه پس از ریزش گلبرگ و گل های بارور نشده و ناقص شمارش (چهار هفته پس از گرده افشانی) شد و تعداد میوه نهایی زمان برداشت ملاک قرار گرفت. تشکیل میوه نیز در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار (خود گرده افشانی و گرده افشانی آزاد) بررسی شد. تشکیل میوه نهایی نسبت میوه به تعداد گل اولیه بصورت درصد محاسبه شد (Hartmann and Neumuller, 2009).

مقایسه میانگین‌های گرده افشانی آزاد با خود گرده افشانی با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و تجزیه کلاستر به روش (Average linkage between groups) و محاسبه فواصل بعد از استاندارد کردن داده‌ها انجام شد.

## نتایج و بحث

با به کار بردن شش جفت آغازگر مربوط به مکان ژن *S-Rnase* و یک جفت آغازگر مکان SFB (SLF) تنوع بالایی در آلل‌های ناسازگاری در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد. آغازگرهای دژنره EM PC2 consFD و EM PC3consRD بر اساس اینترون دوم و مناطق حفاظت شده دوم و سوم *S-RNase* جنس پرونوس در ایستگاه ایست مالینگ انگلستان طراحی شده‌اند (Sutherland *et al*., 2004; Ushijima *et al*., 2004) که نواحی حفاظت شده دوم و سوم را تکثیر می کنند (شکل ۱). با استفاده از این جفت آغازگر ۱۸ باند با اندازه‌های ۲۱۵ جفت باز (سیمکا) تا ۱۷۳۴ جفت باز (شماره ۱۷) در ۱۴ ژنوتیپ و رقم آلو ژاپنی مشاهده شد (جدول۲ ).

اتحاد پور و همکاران (Etahadpour *et al*., 2011) در پژوهشی اندازه باندها را با این آغازگرها در ژنوتیپ‌های آلو و گوجه بین ۳۲۰ تا ۱۸۳۰ جفت باز گزارش کرده‌اند. البته در پژوهش حاضر فقط گونه آلو ژاپنی بررسی شد، در حالیکه در آزمایش اتحادپور و همکاران (Etahadpour, *et al*., 2011) از گونه های مختلف آلو و گوجه استفاده شد. ارتگا و همکاران (Ortega et al., 2006) اندازه باندها را جفت باز در گونه‌های بادام و برخی گونه‌های پرونوس بین ۸۰ تا ۲۸۷۲ گزارش نمودند. دلیل این تفاوت در تعداد ژنوتیپ‌های مورد استفاده و زمینه ژنتیکی آنها می‌باشد. برای اینترون اول اندازه باندها در پژوهش حاضر بین ۲۰۶ تا ۶۲۰

جدول ۲- طول باند *S* و میانگین آلل های تکثیر شده در ارقام و ژنوتیپ‌های آلوی مورد مطالعه در هفت جفت آغازگر (جفت باز)

Table 2: *S* band length and mean of amplified alleles in studied plum cultivars and genotypes in seven primer pairs (bp)

| Genotype | ژنوتیپ | Primer pair جفت آغازگر: EM-PC2F & PC3R Allele based on/ | آغازگر اینترون اول PaConsI-F & EM-PC1R | PaConsI-F & EM-PC5R | SFBc-F & R | آغازگر اینترون دوم PaConsII-F & R | SRC-F & R | آغازگر اینترون دوم EM-PC2F & EM-PC5R | میانگین تعداد آلل ها ی تکثیر شده Mean of amplified alleles |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alu Zard | آلوزرد | *Sc Sf* | 285-206 | 1311-977 | 516-427-378-321 | 565-1366 | 371 | 772-1650 | 2.14 |
| Gatreh tala | قطره طلا | *Sc Sf* | 285-206 | 1254-772 | 516-444-378 | – | - | - | 1.29 |
| Black Star | بلک استار | *Se* | 353 | 1311-1180 | 548-427-278 | 646-1366 | 370 | 2050 | 1.43 |
| Morrettini | مورتینی | *SIII SIV* | 285-255 | 1311-1180 | 548 | 565 | 387 | 772-1759 | 1.57 |
| Simka | سیمکا | *Sk SI* | 353 | 1637-1542-921-642 | 548-427-378 | 446-565 | 387 | 427-737 | 2.14 |
| No. 16 | شماره ۱۶ | *SIV Se* | 321-285-206 | 1448-1097 | 594-378 | 498-1366-1624 | 371-346 | 1650-2050 | 2.29 |
| Oblinaja | ابلنایا | *SII* | 353-321-206 | 1542-1050-642 | 594-378 | 479-565 | 387-346 | 737-827 | 2.14 |
| Angeleno | آنجلنو | *Sh Si* | 500-321-285-206 | 1542-977 | 594-378 | 479-565 | 540-371-346 | 827-1108-1168 | 2.57 |
| No.17 | شماره ۱۷ | *S19 Sf SV* | 386-353 | 1254-772 | 641 | 479 | 409-387 | - | 1.57 |
| Songorabadi | سنقر آبادی | *Se Sd Sb* | 324-300 | 1637-1097 | 609 | 479-1934 | 387-371 | 1534-1733 | 2.00 |
| Black Amber | بلک امبر | *S25 S24 S23* | 620-448-364-300 | – | 541-423 | 565-603-646-757 | 625-540-441-409 | 728-784-1053 | 2.86 |
| Laroda | لارودا | *S25 S24 S23* | 620-518-403-364-324 | 1097-642 | 609-541-423 | 565--646-757 | 625-540-441-409 | 728-784 | 3.14 |
| Vaezi | واعظی | *S22 Se Sb* | 364-233 | 1637-1097 | 609 | 479-1934 | 426-409 | 847-1733 | 2.00 |
| Shiro | شایرو | *Sf* | 233 | 1637-2052 | 609 | 479 | 346 | - | 1.14 |
| Mean of amplified at alleles | میانگین تعداد آلل‌های تکثیر شده | | 2.10 | 2.40 | 2.10 | 2.10 | 1.90 | 1.90 | 1.60 |

جفت باز بود (جدول ۲). در حالی که در بررسی عبداله و همکاران (Abdallah *et al*., 2019) با آغازگرهای دیگر بین ۲۰۸ تا ۳۸۹ جفت باز گزارش شد.

با مقایسه اندازه باندهای بدست آمده با اندازه آلل‌های $S$ موجود در NCBI و دیگر پژوهش ها، برخی از آنها با تفاوت‌های جزئی با آلل‌های گزارش شده یکسان در نظر گرفته شدند (Etahadpour *et al*., 2011; Guerrra *et al*., 2012). تعداد پنج باند با اندازه‌های جدید نیز مشاهده شدند که آلل متناظر با آن‌ها در بین آلل‌های شناخته شده یافت نشد که پس از توالی‌یابی می‌توانند کاندیدای آلل جدید باشند (جدول ۳). بر اساس گزارشات قبلی تنوع آلل‌های $S$ در ۴۰ ژنوتیپ و رقم آلو و گوجه، نه باند با اندازه‌های متفاوت مشاهده شد (Etahadpour *et al*., 2011) و در ۱۷ رقم آلوی ژاپنی ۱۳ آلل جدید ($S_{15}$-$S_{27}$) بدست آمد (Zhang *et al*., 2008).

جدول ۳- اندازه باندهای مشاهده شده در این پژوهش وآلل‌های متناظر در بانک ژن و آلل‌های جدید

Table 3. Size of bands observed in this research and corresponding alleles in gene bank and new alleles

| شماره<br>No. | آلل<br>Allele | آلل متناظر (جفت باز)<br>Corresponding alleles(bp) | تعداد باند مشاهده شده<br>Observed band number | اندازه باند مشاهده شده<br>Observed band size (bp) | تفاوت اندازه مشاهد شده آلل با آلل های متناظر<br>The difference in the size of the alleles observed with the corresponding alleles |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $S_I$ | | 1 | 215 | |
| 3 | $S_k = S_3$ | 372 | 14 | 366 | -6 |
| 4 | $S_i$ | 430 | 7 | 343 | +4 |
| 5 | $S_{II}$ | | 6 | 461 | |
| 6 | $S_{25}$ | 495 | 10 | 492 | -3 |
| 7 | $S_h$ | 532 | 15 | 523 | -9 |
| 8 | $S_{22}$ | 579 | 8 | 574 | -5 |
| 9 | $S_{24}$ | 681 | 20 | 676 | -5 |
| 10 | $S_{19}$ | 712 | 9 | 727 | +15 |
| 11 | $S_{23}$ | 772 | 14 | 799 | +25 |
| 12 | $S_l$ | 907 | 1 | 922 | +15 |
| 13 | $S_{III}$ | | 3 | 952 | |
| 14 | $S_X$ | | 2 | 1102 | |
| 15 | $S_c = S_4$ | 1188 | 10 | 1171 | -17 |
| 16 | $S_f = S_6$ | 1250 | 10 | 1227 | -23 |
| 17 | $S_d$ | 1317 | 2 | 1316 | -1 |
| 18 | $S_e = S_5$ | 1450 | 6 | 1446 | -4 |
| 19 | $S_b$ | 1565 | 3 | 1554 | -11 |
| 20 | $S_{IV}$ | | 1 | 1734 | |

با این آغازگر، شش رقم، دو باند که نشان دهنده هتروزیگوت بودن در مکان آلل‌های $S$

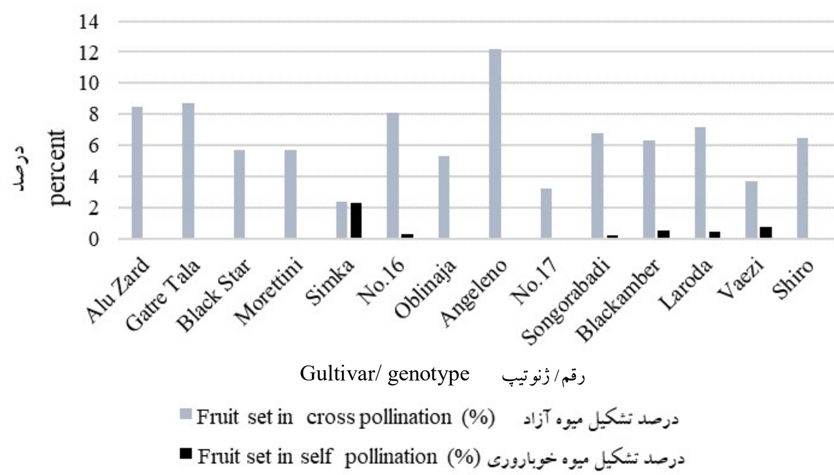
آن‌ها می‌باشد، پنج رقم، سه باند و در دو رقم یک باند نشان دادند. ارقام ابلنایا و شایرو، یک باند نشان دادند که ممکن است به دلیل هموزیگوت بودن مکان آلل‌های $S$ آن‌ها یا عدم شناسایی آلل دوم آن‌ها باشد. اتحادپور و همکاران (Etahadpour *et al*., 2011) گزارش کردند که ۲۳ ژنوتیپ دو باند نشان دادند در حالی که ۱۵ ژنوتیپ دیگر فقط یک باند نشان دادند. همچنین مشخص شده است که تکثیر یک باند در رقم شایرو ($S_f$) ممکن است به دلیل آلل‌های با اندازه اینترون مشابه باشد (Halasz, 2007). در پژوهش حاضر نیز رقم شایرو آلل $S_f$ را نشان داد. بر اساس مطالعات پیشین ارقام آنجلنو آلل $S_cS_h$ و در سیمکا آلل‌های $S_eS_k$ گزارش شده است (Beppu *et al*., 2005; Halasz, 2007)، درحالی که در این پژوهش $S_iS_h$ و $S_iS_k$ شناسایی گردیدند. ممکن است عدم هماهنگی یکی از آلل‌ها بدلیل جهش باشد که در گزارشات دیگر نیز آمده است (Guerra *et al*., 2009).

در آزمایشی که برای شناسایی آلل‌های $S$ در آلوی ژاپنی انجام شد، ژنوتیپ‌های $S$ متفاوتی برای رقم‌های 'Friar' ($S_bS_h$)، 'Kelsey' ($S_fS_k$) و 'Green Sun' ($S_bS_c$) مشاهده شد (Guerrra *et al*., 2009). بپو و همکاران (Beppu *et al*., 2005) آلل‌های $S$ ارقام بلک امبر و لارودا را همانند هم ($S_cS_b$) گزارش نمودند. اما در پژوهش حاضر این دو رقم آلل‌های $S$ همانند هم و به صورت $S_{25}S_{24}S_{23}$ بودند. ارقام آلو زرد و قطره طلا ژنوتیپ $S$ یکسانی داشتند ($S_cS_f$) بنابراین در یک گروه قرارگرفتند و با شایرو در آلل $S_f$ مشترک بودند، شباهت ظاهری آنها می تواند نشان از کلون بودن این سه رقم داشته باشد. این ژنوتیپ‌ها گرده دهنده‌ی مناسبی برای یکدیگر نخواهند بود و برای تولید میوه تجاری به ژنوتیپ‌هایی با آلل‌های $S$ متفاوت نیاز دارند.

بپو و همکاران (Beppu *et al*., 2005) آلل $S_e$ (معادل $S_5$) را آلل خودباروری در آلو معرفی نمودند که معادل ۱۴۵۰ جفت باز برای جفت آغازگر EMPC2consFD و EMPC3consRD است. در این پژوهش ارقام واعظی، سنقرآبادی و شماره ۱۶ دارای این آلل بودند (جدول ۲). آزمایش‌های مربوط به خود یا دگر گرده افشانی که بین واریته‌های دارای ژنوتیپ $S_cS_e$ انجام شد، آلل $S_e$ را به عنوان آلل خودسازگاری معرفی کرد (Beppu *et al*., 2003).

پژوهشگران گزارش کرده اند آلل‌های $S_b$- و $S_t$- ممکن است مسئول خودسازگاری باشند (Beppu *et al*., 2010). ارقام Karari ($S_tS_b$) و Hony Rosa ($S_gS_b$) با ۱۱/۲ درصد تشکیل میوه خودبارور بودند (Guera *et al*., 2009; Beppu *et al*., 2010). ارقام آلو سنقر آبادی و واعظی دارای این آلل می‌باشند. در آزمایش باغی، واعظی ۰/۷۹ درصد خودباروری نشان داد

و سنقرآبادی با ۰/۲۱ درصد خودباروری، تقریبا خودناسازگار بودند (شکل ۲). در بادام آلل خودباروری $S_f$ یا $S25$ با اندازه ۸۵۰ جفت باز با جفت آغازگر EMPC2consFD & EMPC3consRD می باشد که در بادام خودگشن سوپرنوا مشاهده شد، در حالی که آلل خودسازگاری برای جمعیت های بادام ایران بجز در گونه *P. elaegifolia* مشاهده نشده است (Rahemi *et al*., 2010; Zinolabedini *et al*., 2008). در پژوهشی که توسط اتحادپور و همکاران (Etahadpour *et al*., 2011) انجام شد آلل خود باروری در ژنوتیپ‌های ولیان ۴ و آلوی وحشی شناسایی شد.



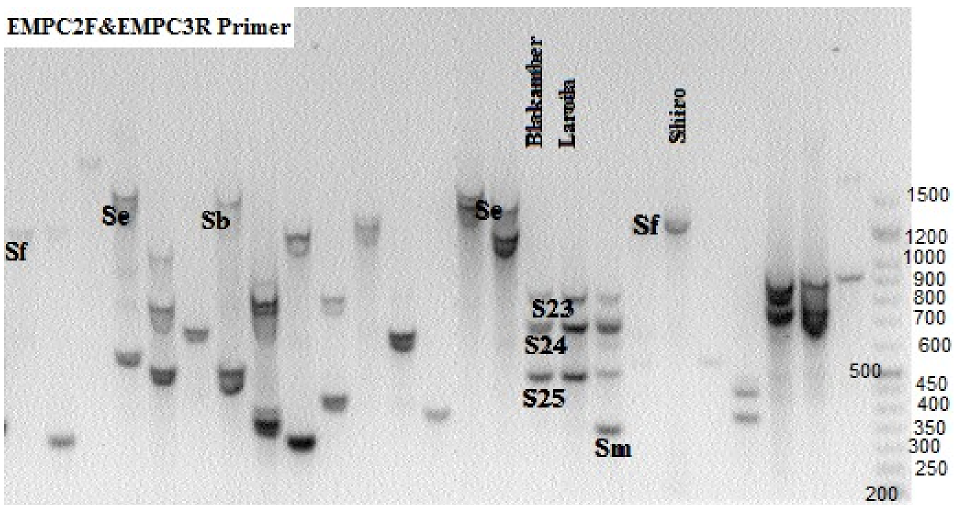

شکل ۲- مقایسه میزان تشکیل میوه در گرده‌افشانی با گرده خودی و گرده افشانی آزاد در ژنوتیپ های آلوی ژاپنی

Fig. 3. Comparison of fruit set in self and cross pollination in Japanese plum

نتایج گرده افشانی با گرده خودی در مقایسه با گرده افشانی آزاد نشان داد که اغلب ارقام مورد بررسی خودناسازگارند و ارقام سیمکا ($S_lS_k$) با ۲/۹ درصد خودباروری نیمه خودناسازگار شناسایی شد. البته در پژوهش دیگری این میزان چهار درصد گزارش شده است (Guerrra *et al*., 2009). آلل سیمکا در منابع $S_eS_k$ گزارش شده است که دارای آلل $S_e$ مسئول خودسازگاری می باشد (Beppu *et al*., 2005; Halasz, 2007)، اما در پژوهش حاضر این آلل برای سیمکا شناسایی نشد که ممکن است به دلیل خطای آزمایش و یا جهش باشد.

در این پژوهش ارقام شماره ۱۶، واعظی

و سـنقرآبادی دارای آلـل $S_e$بودنـد کـه در آزمایشات باغی درصدی از خود باروری نشان دادند (شکل ۲). ارقام بلک امبر و لارودا ($S_cS_b$) ۰/۴ تا ۰/۵ درصد خودباروری نشان دادند که دارای آلل $S_b$ بر اساس منابع می باشد، اما در این پژوهش دارای سه آلـل $S_{25}S_{24}S_{23}$ همانند هم بودند (جدول ۲ و شکل ۳). بیشترین میانگین آلل تکثیر شده در همه آغازگرها مربوط به ارقام لارودا و بلک آمبر و کمترین آلل تکثیر شده مربوط به ارقام شایرو و قطره طلا بود. این دو رقم خصوصیات ظاهری همانند هم دارند. بیشترین میانگین آلل تکثیر شده مربوط به آغازگر اینترون اول (PaConsI-F & EM-PC1R) (۲/۴) بود (جدول ۲).




شکل ۳- الگوی باندی در جفت آغازگر اینترون دوم (EM-PC2F & EM-PC3R)

Fig. 3. Band pattern in the pair of second intron primers (EM-PC2F & EM-PC3R)

اهمیت استفاده از آغازگرهای مختلف در شناسایی آلل‌های خودناسازگاری، تعیین توالی های متناظر بر اساس سطح پوشش ژن و تکثیر آغازگرها است. بعنوان نمونه در این پژوهش آلل $Sc$ با اندازه ۱۱۸۸ جفت باز معادل ۲۰۶ جفت باز با تکثیر آغازگرهای (اینترون اول) (PaConsI-F & EM-PC1R)، ۹۷۷ جفت باز با آغازگرهای (PaConsI-F & EM-PC5R) و ۵۶۵ جفت باز با آغازگرهای (اینترون دوم)(PaConsII-F & R) بود (جدول ۳). عبدالله و همکاران (Abdallah *et al*., 2019) با آغازگرهای PruC2-PCER اینترون دوم، آلل $S_a$ معادل ۴۷۰ جفت باز گزارش کردند که معادل $S_{II}$در پژوهش حاضر و آلل $S_h$ ۵۰۰ جفت بازی معادل ۵۲۳ جفت باز در NCBI می باشد. اندازه این آلل ها در آغازگرهای PaCons1F/PaCons1R2 به ترتیب ۳۸۸ و ۳۸۹ جفت باز بود که از هم قابل تشخیص

نیست.

سازکار خودناسازگاری بوسیله دانه گرده و مادگی در گیاهان اعمال می شود. پس از کشف ژن *S-RNase* بعنوان عامل خودناسازگاری در مادگی، جستجوی برای ژن *S* دانه گرده پس از کلون کردن ژن *S-RNase* شروع شد و مشاهده شد که پروتئین *S* دانه گرده متفاوت با *S-RNase* مادگی است. ژن کاندید برای عامل ناسازگاری در دانه گرده چند شکلی بالایی دارد و در دانه گرده بیان می شود و به *S-RNase* متصل بود (Kao and Tsukamoto, 2004). این ژن در خانواده های اسکروفولاریاسه، سولاناسه و رزاسه شناسایی شد. مطالعات در جنس پرونوس ژن های *SLF (SFB)* چند شکلی همانند با ژن *S-RNase* مادگی نشان داد(McClure and Franklton, 2006) که یک الگوی تلاقی اختصاصی -*S* هاپلوتایپ (*S*-haplotype –Specific Hybridization) را نشان می هد. این مکان هم مانند *S-RNase* توع بسیار بالایی را نشان می دهد. تجزیه توالی ۱۳ آلل ژن *SLF* در جنس پرونوس نشان دهنده دامنه های حفاظت شده و دامنه با تنوع بالا است (Ikeda *et al*., 2004; Ushijima *et al*., 2004).

پروتئین های *SLF* و *S-RNase* اساس نظام خودناسازگاری (Self Incompatibility) هستند (Qiao *et al*., 2004). در جنس پرونوس ناحیه *S* کمتر از ۷۰ کیلو جفت باز است (Ushijima *et al*., 2004). در این تحقیق با آغازگر SFBc-F & R به ارزیابی آلل‌های متناظر روی این ژن پرداخته شد که نشان از تنوع بالای این مکان ژنی دارد (جدول ۳). در جنس پرونوس دو ژن *SLF* و *S-RNase* با فعالیت ریبو نوکلئازی با تنوع بالا در این ناحیه حضور دارند (Ushijima *et al*., 2004; Wang *et al*., 2005). فاصله بین این دو ژن در جنس پرونوس ۳۸۰ جفت باز تا ۴۹ کیلو جفت باز است (Romero *et al*., 2004; Yamane *et al*., 2005).

همزمانی دوره گلدهی از ضروریات تشکیل میوه است (Verma and Jindal, 1997). آلوهای ژاپنی زود گل هستند و تفاوت زود گل ترین رقم (بلک استار) و دیرگل ترین رقم (مورتینی) حدود ده روز بود (جدول ۴) که در پژوهش دیگری ۱۱ روز گزارش شده است (Ganji Moghaddam *et al*., 2010). اغلب ارقام همپوشانی گلدهی دارند فقط این دو رقم برای ابتدای گلدهی (بلک استار) و انتهای گلدهی (مورتینی) مشکل گرده‌زا دارند. برای رفع مشکل همپوشانی بلک استار ($S_eS_f$) با توجه به اینکه زودگل ترین رقم آلو ژاپنی در کشور است می توان از ارقام گوجه سبز برای دوره ابتدایی گلدهی و شماره ۱۷ ($S_{19}$ $S_f$ $S_V$) و شماره ۱۶ ($S_{IV}S_e$) بیشترین همپوشانی را دارند، اما هر دو دارای یک آلل مشترک هستند (جدول ۳).

بر اساس نتایج گرده افشانی کنترل شده، گرده زای مناسب برای بلک استار رقم برموزا

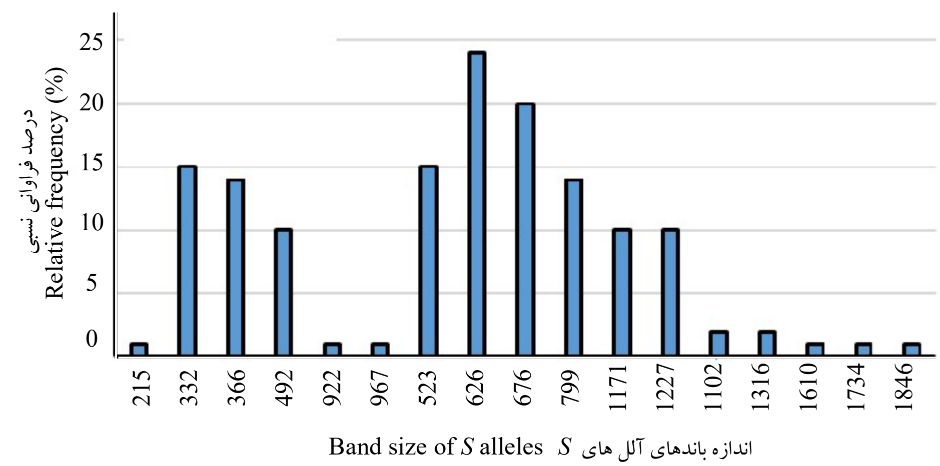
جدول ۴- همپوشانی دوره گلدهی ارقام و ژنوتیپ‌های آلوی مورد استفاده در این پژوهش

Table 4. Blooming period coverage of plum cultivars and genotypes used in this study

| | سیمکا<br>Simka | ابلنایا<br>Oblinaja | مورتینی<br>Morrettini | سنقر آبادی<br>Singorabadi | آلوزرد<br>Alu Zard | بلک امبر<br>Black Amber | لارودا<br>Laroda | آنجلنو<br>Angeleno | بلک استار<br>Black Star | شماره ۱۶<br>N.o 16 | شماره ۱۷<br>No. 17 | قطره طلا<br>Qolden Tala | واعظی<br>Vaezi | شایرو<br>Shiro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | First year سال اول | | | | | | | |
| شروع گلدهی | ۲۹ اسفند | ۳۰ اسفند | ۳ فرودین | ۲۷ اسفند | ۲۸ اسفند | ۲۷ اسفند | ۲۹ اسفند | ۳۰ اسفند | ۲۲ اسفند | ۲۵ اسفند | ۲۵ اسفند | ۲۸ اسفند | ۲۶ اسفند | ۲۷ اسفند |
| Blooming start | 19 March | 20 March | 23 March | 17 March | 18 March | 17 March | 19 March | 20 March | 12 March | 15 March | 15 March | 18 March | 16 March | 17 March |
| خاتمه گل | ۱۱ فروردین | ۱۲ فروردین | ۱۴ فروردین | ۱۰ فروردین | ۹ فروردین | ۱۰ فروردین | ۱۲ فروردین | ۱۳ فروردین | ۶ فروردین | ۹ فروردین | ۸ فروردین | ۹ فروردین | ۷ فروردین | ۸ فرودین |
| Blooming end | 01 April | 02 April | 04 April | 30 March | 29 March | 30 March | 02 April | 03 March | 26 March | 29 March | 28 March | 29 March | 27 March | 28 March |
| | | | | | | | Second year سال دوم | | | | | | | |
| شروع گلدهی | ۲۲ اسفند | ۲۳ اسفند | ۲۵ اسفند | ۲۰ اسفند | ۲۲ اسفند | ۲۰ اسفند | ۲۲ اسفند | ۲۳ اسفند | ۱۶ اسفند | ۱۹ اسفند | ۱۹ اسفند | ۲۲ اسفند | ۲۰ اسفند | ۲۱ اسفند |
| Blooming start | 12 March | 13 March | 15 March | 10 March | 12 March | 10 March | 12 March | 13 March | 06 March | 09 March | 09 March | 12 March | 10 March | 11 March |
| خاتمه گل | ۶ فروردین | ۷ فروردین | ۹ فروردین | ۴ فروردین | ۳ فروردین | ۴ فروردین | ۶ فروردین | ۸ فروردین | ۱ فروردین | ۵ فروردین | ۵ فروردین | ۷ فروردین | ۵ فروردین | ۵ فروردین |
| Blooming end | 26 March | 27 March | 29 March | 24 March | 23 March | 24 March | 26 March | 28 March | 21 March | 25 March | 25 March | 27 March | 25 March | 25 March |

(با ۵ تا ۱۲ درصد تشکیل میوه در مقایسه با گرده‌افشانی آزاد ۱۶ درصد) می باشد. مورتینی یکی از بهترین ارقام زودرس و دیر گل است (سازکار فرار از سرماهای بهاره)، بهترین گرده زاها برای مورتینی، ارقام شماره ۱۶ با ۶/۱۵ درصد تشکیل میوه و بلک امبر با ۵/۱ درصد تشکیل میوه در مقایسه با ۷/۶ درصد گرده افشانی آزاد بودند. در مقابل گرده افشانی با گرده رقم آنجلنو ۰/۲۲ درصد تشکیل میوه نشان داد (داده‌های ارائه نشده است).

نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین فراوانی نسبی آللی برای جفت آغازگر EM $PC_2$ consFD & EM $PC_3$consRD در اندازه باندهای ۶۲۶ و ۶۷۶ جفت باز به ترتیب ۲۴ و ۲۰ درصد بود (شکل ۴). در گزارش اتحادپور و همکاران (Etahadpour *et al*., 2011) فراوانی آلل $S_c$، باند ۶۲۱ و آلل $Si$ به ترتیب با ۳۰، ۱۷/۵ و ۱۲/۵ درصد بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ‌های آلوی ایرانی داشتند که آلل $S_c$ بیشترین فراوانی (۱۷/۱ درصد) را در جمعیت ولیان کرج نشان داد. فراوانی آلل‌های $S$ با منشا جغرافیایی گونه‌ها ارتباط دارد چراکه فراوانی آلل‌های مناطق مختلف با هم متفاوت هستند (Hegedus and Halasz, 2007). در خصوص ژنوتیپ‌های آلو نیز با پراکنش جغرافیایی و منشا فراوانی آلل‌ها ارتباط دارد.

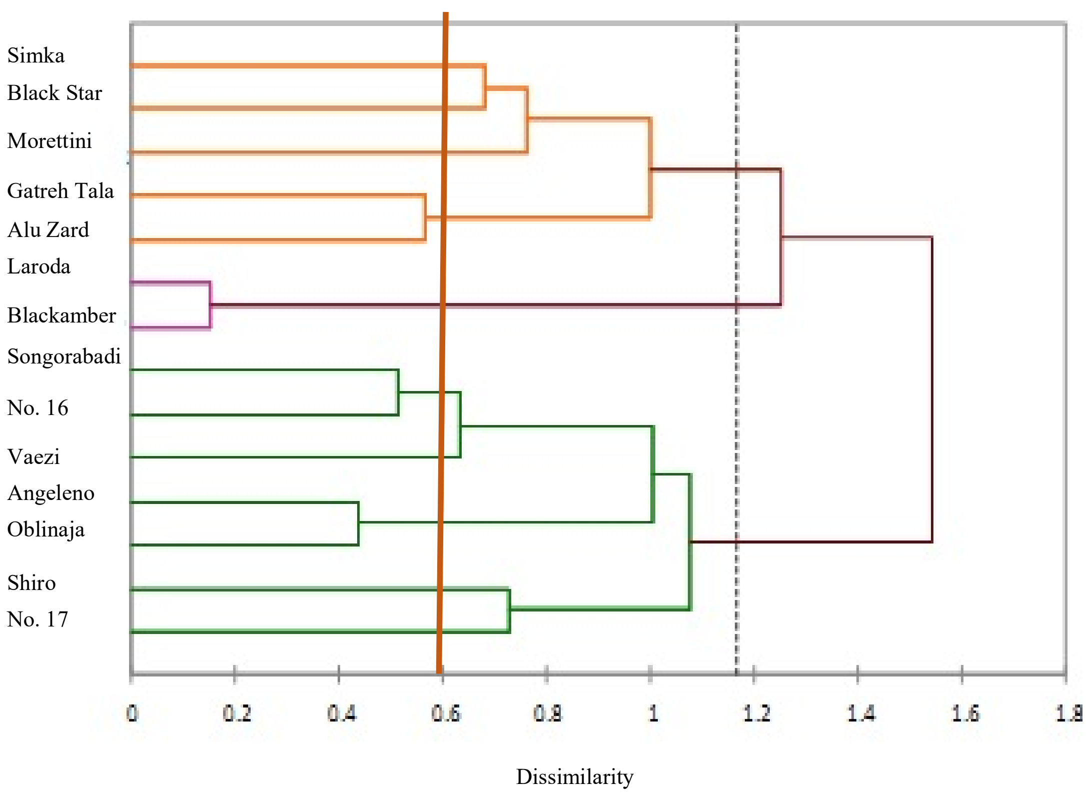



شکل ۴- مقایسه فراوانی نسبی آلل‌های $S$ در ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلو با استفاده از جفت آغازگر EM $PC_2$ consFD & EM $PC_3$consRD

Fig. 4 . Comparison of relative frequency of *S*-alleles in studied plum genotypes using EM PC2 consFD & EM PC3consRD pairs of primers

گروهای ناسازگاری ۱۰۵ رقم آلوی ژاپنی را بوسیله تکثیر ژن *S_RNase* و *SFB* به روش

PCR مشخص کردند که ۲۱ گروه ناسازگاری جدید توصیف شد (Guerrra *et al.*, 2012). در این پژوهش در فاصله اقلیدسی ۰/۶ ارقام و ژنوتیپ‌ها به چهار گروه و شش ژنوتیپ مستقل تقسیم شدند (شکل ۵). در این گروه‌بندی برخی هم گروه ها دارای آلل های کاملا مشابه و برخی دارای حداقل یک آلل مشابه بودند (شکل ۵). گروه اول شامل سیمکا، بلک استار، مورتینی، قطره طلا و آلو زرد بود. در گروه دوم شامل لارودا و بلک امبر قرار گرفتند. سنقر آبادی، شماره ۱۶، واعظی، آنجلنو و ابلنایا گروه سه را تشکیل دادند. شایرو و شماره ۱۷ در گروه چهار بودند (شکل ۵). در تقسیم بندی گروه‌های اصلی ارقام با آلل‌های مشابه در کنار هم قرار گرفتند.




شکل ۵- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۱۴ رقم و ژنوتیپ آلو بر اساس صفات مولکولی

Fig. 4. Dendrogram of cluster analysis of 14 plum cultivars and genotypes based on molecular traits

## References

**Abdallah, D., Baraket, G., Perez, V., Mustapha, S. B., Salhi-Hannachi, A., and Hormaza, J. I. 2019.** Analysis of self-incompatibility and genetic diversity in diploid and hexaploid plum genotypes. Front Plant Science 10: 896.

**Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., and Tao, R. 2003**. Determination of *S*-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78: 315–318.

**Crane, M. B., and Lewis, D. 1942.** Genetic studies in pears. III. Incompatibility and sterility. Journal of Genetics 43: 31-44.

**Feng, J., Chen, X., Wu, Y., Liu, W., Liang, Q., and Zhang, L. 2006.** Detection and transcript expression of *S-RNase* gene associated with self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Molecular Biology Reports 33: 215-221.

**Ganji Moghaddama, E., Hossein Ava, S., Akhavan, S., and Hosseini, S. 2010.** Phenological and pomological characteristics of some plum (*Prunus* spp.) cultivars grown in Mashhad, Iran. Crop Breeding Journal 1 (2): 105-108.

**Gu, Q., Zhang, Q., Hu, H., Chen, Q., and Luo, Z. 2009.** Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) by PCR-RFLP analysis. Agricultural Sciences in China 8: 154-160.

**Guerra, M. E., Rodrigo, J., Lopez- Corrales, M., and Wunsch, A. 2009.** *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. Plant Breeding 128: 304-311.

**Guerra, M. E., Wunsch, A., Lopez-Corrales, M., and Rodrigo, J. 2011.** Lack of fruit set caused by ovule degeneration in Japanese plum. Journal of the American Society for Horticultural Science 136 (6): 375–381

**Halasz, J., Fodor, A., Hegedus, A., and Pedryc, A. 2008.** Identification of a new self-incompatibility allele (*S31*) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. Scientia Horticulturae 116: 448–451.

**Hegedus, A., and Halasz, J. 2006.** Self-incompatibility in plums (*Prunus salicina* Lindl., *Prunus cerasifera* Ehrh. and *Prunus domestica* L.). International Journal of Horticultural Science 12: 137–140.

**Hiratsuka, S., and Zhang, S. L. 2002.** Cultivar differences in the expression of self-incompatibility in Japanese pears. Acta Horticulturae 587: 437-448.

**Ishimizu, T., Inoue, K., Shimonaka, M., Saito, T., Terai, O., and Norioka, S. 1999.** PCR-based method for identifying the *S* genotypes of Japanese pear cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98: 961-967.

**Lopez, M., Vargas, F. J., and Batlle, I. 2006.** Self-incompatibility in almond genotypes: a review. Euphytica 150: 1-16.

**Murfett, J., Cornish, E. C., Ebert, P. R., Bonig, I., Mcclure, B. A., and Clarke, A. E. 1992.** Expression of a self-incompatibility glycoprotein (S2-Ribonuclease) from *Nicotiana alata* in transgenic *Nicotiana tabacum*. Plant Cell 9: 1063-1074.

**Murray, H. G., and Thompson, W. F. 1980**. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.

**Ortega, E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Boskovic, R., and Tobutt, K. R. 2005.** Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new *S*-alleles and correction of reported *S* genotypes. Plant Breeding 124: 188–196.

**Pirkhezri, M. 2019.** *S*-genotyping of some greengage cultivars and genotypes in Iran (*Prunus cerasifera* Ehrh.) by PCR. pp. 1-5 In: Proceedings of the11th National Horticultural Science Congress of Iran. (in Persian).

**Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., and Saparro, J. 2010.** Genetic variation of *S*-alleles in wild almonds and their related *Prunus* species. Agriculture Journal of Crop Science 4 (8): 648-659.

**Ruck, H. C. 1975.** Deciduous fruit tree cultivars for tropical and subtropical regions. Horticultural Reviews 3: 84-172.

**Sapir, G., Raphael, A. S., Shafir, S. H., and Goldway, M. 2008.** *S-RNase* based *S*-genotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar-couples in the orchard. Scientia Horticulturae 118: 8-13.

**Saure, M. C. 1985.** Dormancy release in deciduous fruit trees. Horticultural Review 7: 239-287.

**Sutherland, B. G., Robbins, T. P., Tobutt, K. R. 2004.** Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. Plant Breeding 123: 582–584.

**Szabo, Z. 2003.** Plum (*Prunus domestica* L.). pp. 515–522. In: Kozma, P., Nyeki, J., Soltesz, M., Szabo, Z. (eds.): Floral biology, pollination and fertilization in temperate zone fruit species and grape. Akademiai Kiado, Budapest.

**Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M.,**

**and Hirano, H. 1998**. Cloning and characterization of cDNAs encoding *S-RNases* from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the *S-RNases* in Rosaceae. Molecular and General Genetics 260: 261–268.

**Ushijima, K. H., Yamane, A., Watari, E., and Kakehi, K. 2004.** The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. Plant Journal 39: 573–586.

**Verma, L. R., and Jindal, K. K. 1997.** Fruit crop pollination. Kalyani Publication, Ludhiana, India. 405 pp.

**Vilanova, S., Badenes, M. L., Burgos, L., Martınez-Calvo, J., Llacer, G., and Romero, C. 2006.** Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. Plant Physiology 14: 629– 641.

**Wang, H., Zhang, K., Su, H., and Naihaoye, K. 2010.** Identification of the *S*-genotypes of several sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars by AS-PCR and pollination. African Journal of Agricultural Research 5: 250-256.

**Yamane, H., Tao, R., and Sugiura, A. 1999**. Identification and cDNA cloning for *S-RNases* in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). Plant Biotechnology 16: 389-396.

**Zhang, S. J., Huang, S. X., Heng, W., Wu, H. Q., and Zhang, S. L. 2008.** Identification of *S*-genotypes in 17 Chinese cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and molecular characterization of 13 novel *S*-alleles. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 83: 635–640